

BIOSENSOR

Publication number: JP2004527769 (T)

Publication date: 2004-09-09

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: G01N27/327; G01N27/416; G01N33/543; G01N27/327;
G01N27/416; G01N33/543; (IPC1-T): G01N27/327;
G01N27/416

- European: G01N33/543K2B; Y01N6/00

Application number: JP20030500546T 20020530

Priority number(s): KR20010030169 20010530; KR20010045720 20010728;
WO2002KR01023 20020530

Also published as:

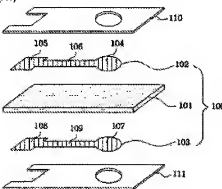
JP4057521 (B2)
WO02097416 (A1)
US2004140209 (A1)
US7455756 (B2)
EP1390733 (A1)

more >>

Abstract not available for JP 2004527769 (T)

Abstract of corresponding document: WO 02097416 (A1)

A biosensor, for use in measurement of an analyte, includes a microporous membrane support, a first electrode system, a second electrode system, and a pair of insulating films. The first electrode system is formed on the surface of the microporous membrane support and the second electrode system is formed on the opposite surface of the microporous membrane support. The biosensor enables a rapid, simple, separation-free, and selective detection of the analytes. The biosensor does not require any bulky additional electrode, so that miniaturization, point-of-care testing, and disposability can be achieved.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-527769

(P2004-527769A)

(43) 公表日 平成16年9月9日 (2004.9.9)

(51) Int. Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 27/327

GO 1 N 27/30 3 5 3 Z

GO 1 N 27/416

GO 1 N 27/30 3 5 3 R

GO 1 N 27/46 3 5 1

GO 1 N 27/46 3 3 8

GO 1 N 27/46 3 3 6 G

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-500546 (P2003-500546)
 (86) (22) 出願日 平成14年5月30日 (2002.5.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年12月1日 (2003.12.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2002/001023
 (87) 国際公開番号 W02002/097416
 (87) 国際公開日 平成14年12月5日 (2002.12.5)
 (31) 優先権主張番号 2001/30169
 (32) 優先日 平成13年5月30日 (2001.5.30)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 2001/45720
 (32) 優先日 平成13年7月28日 (2001.7.28)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

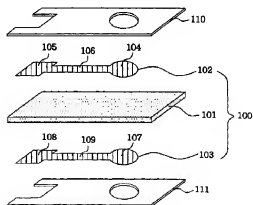
(71) 出願人 501288359
 アイセンス、インコーポレーテッド
 大韓民国、ソウル 139-701, ノウ
 オンク、ウォルジードン, 447-1
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 チョイ ムンヘー
 大韓民国 キョンギ ウィジェオングプ
 ホワンードン ウースング サード アパ
 ートメント 303-1302

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンサー

(57) 【要約】

分析物質を測定するのに使用されるバイオセンサーは、多孔性薄膜、第1電極系、第2電極系、及び1対の絶縁膜を含む。第1電極系は多孔性薄膜の一表面に形成され、第2電極系は多孔性薄膜の反対側表面に形成されている。バイオセンサーは迅速かつ簡便であり、分離する必要なしに分析物質を選択的に検出できるようにする。バイオセンサーは、いかなる嵩張る電極も追加的に必要としないため、小型化、現場測定及び使い捨て測定が可能である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】

多孔性薄膜；

生物学的に活性ある物質が固定されている作動電極、第1電極連結部、及び第1リード排出口からなる第1電極系；

カウンター電極、第2電極連結部、及び第2リード排出口からなる第2電極系；及び作動電極、第1電極連結部、カウンター電極、及び第2電極連結部を除外した第1電極系と第2電極系の表面を覆っている1対の絶縁膜を含み、

前記第1電極系が多孔性薄膜の一表面に形成されていて、前記第2電極系が多孔性薄膜の反対側表面に形成されているバイオセンサー。 10

【請求項2】

前記第1電極系及び第2電極系が電気的に伝導性ある物質で対称的に製造されている、請求項1記載のバイオセンサー。

【請求項3】

前記第1電極系及び第2電極系が電気的に伝導性ある物質で非対称的に製造されている、請求項1記載のバイオセンサー。

【請求項4】

前記第1リード排出口及び第2リード排出口及び連結部が絶縁膜から分離され遂行される、請求項1記載のバイオセンサー。 20

【請求項5】

前記第1絶縁膜及び第2絶縁膜が形成された電気的連結部を別個に含み、前記対称的または非対称的の二重-対面電極が絶縁膜間に積層されていて、絶縁膜の連結部に連結されている、請求項2記載のバイオセンサー。

【請求項6】

前記電気的に伝導性ある物質が、金、白金、銀、塩化銀、ロジウム、イリジウム、ルテニウム、パラジウム、オスミウム、炭素、銅、及びこれらの混合物からなる群から選択される、請求項2記載のバイオセンサー。

【請求項7】

前記多孔性薄膜が、有機高分子、無機高分子、天然繊維または合成繊維、紙、及びセラミックスからなる群から選択される、請求項1記載のバイオセンサー。 30

【請求項8】

前記多孔性薄膜が、多孔性ナイロンメッシュである、請求項1記載のバイオセンサー。

【請求項9】

試験用試料をバイオセンサーに注入するための多孔性物質で作られた薄い膜と注入された試料を除去する吸収パッドをさらに含む、請求項1記載のバイオセンサー。

【請求項10】

前記生物学的に活性ある物質が、酵素である、請求項1記載のバイオセンサー。

【請求項11】

前記酵素が、グルコース酸化酵素、グルコース脱水素酵素、ラクテート酸化酵素、コレステロール酸化酵素、グルタメート酸化酵素、西洋ワサビ過酸化酵素、アルコール酸化酵素、グルタメートビルベートアミノ基転移酵素、及びグルタメートオキサロアセテートアミノ基転移酵素からなる群から選択される、請求項10記載のバイオセンサー。 40

【請求項12】

前記生物学的に活性ある物質が、電子伝達媒介体と酵素の結合体である、請求項10記載のバイオセンサー。

【請求項13】

前記電子伝達媒介体が、ヘキサアミルテニウム(III)クロライド、カリウムフェリシアニド、カリウムフェロシアニド、ジメチルフェロセン、フェリシニウム、フェロセン-モノカルボキシル酸、7,7,8,8-テトラシアノキノジメタン、テトラチアフルバレン、ニッケル 50

ロセン、N-メチルアジニウム、テトラチアテトラセン、N-メチルフェナジニウム、ヒドロキノン、3-ジメチルアミノベンゾイック酸、3-メチル-2-ベンゾチオゾリノンヒドラゾン、2-メトキシ-4-アリルフェノール、4-アミノアンチピリン、ジメチルアニリン、4-アミノアンチピレン、4-メトキシナフトール、3,3,5,5-テトラメチルベンジジン、2,2-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホナート]、o-ジアニシジン、o-トルイジン、2,4-ジクロロフェノール、4-アミノフェナジン、ベンジジン、及びプルシアンブルーからなる群から選択される、請求項12記載のバイオセンサー。

【請求項14】

作動電極上部に酵素-分析物質接合体または酵素-抗体接合体(蛋白質安定剤または緩衝塩を含むかまたは含まない)を含むパッド；

10

カウンター電極下に基質(蛋白質安定剤または緩衝塩を含むかまたは含まない)を含む空き空間またはパッド；及び

パッド上部に孔がある1対のカバー

をさらに含む、請求項1記載のバイオセンサー。

【請求項15】

作動電極上部に酵素-分析物質接合体または酵素-抗体接合体(蛋白質安定剤または緩衝塩を含むかまたは含まない)を含むパッド；

カウンター電極下に基質(蛋白質安定剤または緩衝塩を含むかまたは含まない)を含む空き空間またはパッド；及び

パッド上部に孔がある1対のカバー

20

をさらに含む、請求項2記載のバイオセンサー。

【請求項16】

作動電極上部に酵素-分析物質接合体または酵素-抗体接合体(蛋白質安定剤または緩衝塩を含むかまたは含まない)を含むパッド；

カウンター電極下に基質(蛋白質安定剤または緩衝塩を含むかまたは含まない)を含む空き空間またはパッド；及び

パッドを含む生物活性物質の上部に孔がある上部カバーと、基質注入口がある下部カバーと、カウンター電極下に毛細管に連結された貯蔵所

をさらに含む、請求項2記載のバイオセンサー。

【請求項17】

前記生物学的に活性ある物質が選択された抗原に特異的な抗体である、請求項14記載のバイオセンサー。

30

【請求項18】

前記接合された酵素が還元酵素または酸化酵素から選択される、請求項14記載のバイオセンサー。

【請求項19】

前記生物学的に活性ある物質が作動電極に物理的にまたは化学的に固定されている、請求項10記載のバイオセンサー。

【請求項20】

酵素-分析物質接合体または酵素-抗体接合体及び分析物質がある第1チェンバー；及び酵素の基質がある第2チェンバー

40

をさらに含み、前記第1電極及び第2電極が形成されている多孔性薄膜が前記第1チェンバーと第2チェンバー間に形成される、請求項1記載のバイオセンサー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、バイオセンサーに関するものである。より詳細には、多孔性薄膜、第1電極系、第2電極系、及び1対の絶縁膜からなっていて、前記第1電極系が多孔性薄膜の一表面に形成されていて、第2電極系が多孔性薄膜の反対側表面に形成されているバイオセンサー

50

に関するものである。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

バイオセンサーは、適当な試料と接触した時、目標とする分析物質が存在する場合、電気的な信号を生成する装置、探針または電極を意味する。一般的に、バイオセンサーは、分析物質の濃度を定量可能な信号に転換させるために適当な誘導システムを持った接触面に、生物学的活性がある物質を固定させることによって製造する。

【0003】

色々な長所にもかかわらず、現在使用可能なバイオセンサーは、多くの問題点を持っている。化学的妨害物質、環境に対する影響、長期間の安定性、信号に対するノイズ比率及びセンサー包装システムの考案。

【0004】

バイオセンサーの開発において、下記の内容が注目に値する：

- a) 小型化、
- b) 一つ以上の感応要素を結合した配列センサーシステムによる多数の反応物の測定、
- c) 大量生産可能で使い捨てに使用できるセンサーの開発、
- d) 移植可能なバイオチップを使用したインビボ分析(in vivo analysis)、
- e) 人工知能システムを持った配列センサーシステムでの結果算出。

【0005】

一方、蛋白質検出のために迅速かつ簡単な非分離形方法を開発することは、長い間目標にされてきた。色素生産性及び蛍光性ガラクトシド-デキストラン基質が、C-反応性蛋白質、フェリチン及び免疫グロブリンのための均一性酵素免疫分析(EIA)を考案するのに使用されてきた(Gibbons等, 「Homogeneous Enzyme Immunoassay for Proteins Employing β -Galactosidase」, Analytical Biochemistry, 1980年、第102巻、P.167-170 ; 及びArmenia等, 「Improved Sensitivity in Homogeneous Enzyme Immunoassays Using a Fluorogenic Macromolecular Substrate: An Assay for Serum Ferritin」, Analytical Biochemistry, 1985年、第146巻、P.211-219)。しかし、実際使用において、均一性プロトコールで酵素活性を低く変形させることは、前記方法を非実用的にした。

【0006】

また、二個の固体相のポリスチレンラテックス-結合されたアビジンとポリスチレンラテックス-結合された分析物質間に酵素接合体(ビオチン-グルコース-6-ホスファート脱水素化酵素-抗体)の分配によって変化する、巨大分子のための非分離形二重固体相EIAが報告された(Schray等, 「Separation-Free Dual Solid Phase Enzyme Immunoassay for Macromolecules」, Analytical Chemistry, 1988年、第60巻、P.353-56)。しかし、このような分析方法は、酵素が検出可能な生成物を生成するようにするためには24時間を必要とする。

【0007】

EIAが結合された電気化学的検出が有効であると長い間認識されてきた。電極は、試験用試料の色または懸濁度に対しては感応できないため、全体血液試料に直接的に適用できる方法を開発するのに使用できる。しかし、EIAまたは免疫センサーを考案するために電気化学的検出を使用することに対して公知されている大部分の多くの報告書は、抗体が与えられた電極の表面に固定されている非均一性分析配列で固体相のこのようなセンサーを使用することに重きを置いている。他の反応物質と試料を培養した後は、結合された酵素活性を測定するために必要な基質を添加する前に電極の表面を洗浄しなければならない。

【0008】

具体的な実施例として、コゼット(Cozzette)等により1991年11月5日に登録された米国特許第5,063,081号によると、抗原のような特異的な分析物質を検出するためのリガンド/リガンド受容体を基礎にしたバイオセンサーを公知している。前記基礎バイオセンサーは、イリジウム、金、白金または銀のような転移金属を使用した触媒指示電極を含むが、これ

10

20

30

40

50

は、例えば、銀及び塩化銀(段落25-26)で製造されていて結合された形態の基準電極とカウンター電極に取り囲まれている。抗体は基礎センサーに固定されている。結果的に作られるバイオセンサーは、試料及び第2分析物質特異的な抗体を含む混合物と接触するようになり、これは表示化されている(段落45-46)。また、選択透過的なシラン層が妨害物質を選び分けるための選り分け膜に使用された。しかし、結合しない物質及び電気的活性がある妨害物質は、洗浄溶液を使用したりまたは洗浄溶液として酵素基質を含んでいる溶液を使用することによってセンサーから除去される(段落 47-49)。

【0009】

また他の実施例として、メイエルホフ(Meyerhoff)等により1998年11月3日に登録された米国特許第5,830,680号によると、カセット(cassette)と接触して大量溶液から発生するある背景信号に対して分析信号を検出できる酵素サンドウィッチ免疫分析カセットを公知している。前記カセットは、その一つの面が伝導性金属層でコーティングされた多孔性薄膜と前記多孔性薄膜の第1空間に伝導性金属層が固定されている第1捕獲抗体層を含む。図1を参照すると、図1は拡散セルの配置を図示化したもので、前記カセットは補助電極または基準電極をさらに必要とし、小型化及び現場測定はできないことが分かる。

【0010】

ゆえに、本発明が属する従来及び現在の研究にもかかわらず、前記記述した問題点を克服できる新しいバイオセンサーの開発が必要である。

【発明の開示】

【0011】

発明の概要

本発明の目的は、多孔性薄膜、生物学的に活性がある物質が固定されている第1電極系、第2電極系、及び一对の絶縁膜を含み、前記第1電極系は多孔性薄膜の一表面に形成されていて、前記第2電極系は多孔性薄膜の反対側表面に形成されているバイオセンサーを提供することである。

【0012】

本発明のまた他の目的は、多孔性薄膜、生物学的に活性がある物質が固定されている第1電極系、第2電極系、1対の絶縁膜、パッド、及び孔がある1対のカバーを含み、前記第1電極系は多孔性薄膜の一表面に形成されていて、第2電極系は多孔性薄膜の反対側表面に形成されていて、酵素-分析物質接合体または酵素-抗体接合体がパッドに固定されているバイオセンサーを提供することである。

【0013】

本発明による好ましい実施例は、添付した図面を参考にして理解でき、前記参照番号は対応部分に同一に使用する。

【0014】

発明の詳細な説明

本発明は、多孔性薄膜、第1電極系、第2電極系、及び1対の絶縁膜(または電極連結部がある1対の絶縁基質)を含み、前記第1電極系は多孔性薄膜の一表面に形成されていて、第2電極系は多孔性薄膜の反対側表面に形成されているバイオセンサーを提供する。本発明によるバイオセンサーは、追加的ないかなる電極も必要としない。

【0015】

図2A及び図2Bを参照すると、本発明によるバイオセンサーに使用される電気化学的電池100は、多孔性薄膜101、第1電極系102、及び第2電極系103を含む。第1電極系102は、生物学的に活性がある物質が固定されている作動電極104、第1電極連結部105、及び第1リード排出口106からなっている。第2電極系は、カウンター電極107、第2電極連結部108及び第2リード排出口109からなっている。第1電極系102と第2電極系103は、電極連結部105、108の連結、例えば押着クリップまたは半田付けにより電気的に連結されている。

【0016】

図2Bないし図2Fを参照すると、図2Aのバイオセンサーの変形された形態で、本発明によるバイオセンサーに使用される電気化学的電池100は、多孔性薄膜101、第1電極系102、及び

10

20

30

40

50

第2対称(図2B)または非対称(図2C)電極系103を含む。第1電極系102は、生物学的に活性がある物質が固定されている作動電極104、上部絶縁膜の底面に形成されている第1電極連結部105、及び第1リード排出口106からなっている。第2電極系は、カウンター電極107、絶縁膜下部の上部表面に形成されている第2電極連結部108、及び第2リード排出口109からなっている。第1リード排出口106及び第2リード排出口109は、第1電極連結部105及び第2電極連結部108と連結されている。また、上部膜の一部底面に形成されている第1連結部105'と下部膜の表面に形成されている第1電極連結部105が下部基質で対面する方向に二個の連結部105、105'が配列され連結されている。第1電極系102及び第2電極系103は、ソケットに挿入することによって電極連結部105、108を連結させ電氣的に連結されている。

【0017】

第1及び第2電極系102、103は、化学的蒸着または物理的蒸着によって電氣的に伝導性ある物質をスパッタリングすることによってまたは電氣的に伝導性ある物質をスクリーンプリントすることによって形成される。第1及び第2電極系102、103を形成するために使用できる電氣的に伝導性ある物質の例として、伝導性ある高分子、炭素及び金、白金、銀、ロジウム、イリジウム、ルテニウム、パラジウム、オスミウムまたは銅のような伝導性ある金属を含むが、これに限定されるものではない。電氣的に伝導性ある物質は、約150Å〜約1000Åの厚みで多様化された層内部に形成する。さらに好ましくは、伝導性ある物質層の厚みは200Å〜800Åである。伝導性ある物質層の最も好ましい厚みは、300Å〜600Åである。

【0018】

多孔性薄膜101を形成するために使用できる物質は、酵素、電子伝達媒介体及び抗体のような生物学的に活性ある物質を電極系に固定させるためによく使用される有機溶媒と両立できなければならない。また、多孔性構造内に破れやその他の変形に耐えるために充分に高い張力を持っていなければならない。多孔性薄膜101を形成するために使用できる物質の例として、有機高分子(ナイロン、ニトロセルロース、ポリビニリデンジフルオライド、ポリスルホン、ポリエステルまたはポリカルボナート)または多孔性セラミックまたは吸湿性セラミックのような無機物質を含む。多孔性ナイロメッシュは親水性であり、実質的に湿潤剤がない形態での商業上利用が可能であるため好ましい。

【0019】

膜に伝導性ある物質層をコーティングした後も、膜は約0.01ミクロンないし10ミクロン範囲の空隙を持った多孔性になり得る。理論的には、空隙の大きさをさらに大きくすることが可能であるが、これは空隙を部分的に埋めるために使用される追加伝導性物質の費用により制限される。好ましい平均空隙の大きさは、約0.2μm〜約0.45μmである。このような空隙の大きさは、5000Da以上の分子量を持った基質だけではなく分析物質が空隙を貫通することを可能にする。

【0020】

電気化学的電池100の表面は、作動電極104、第1電極連結部105、カウンター電極107、及び第2電極連結部108を除いて、絶縁膜110、111で覆われている。絶縁膜110、111を形成するために使用され得る物質は、ポリビニルクロライドまたはポリビニルクロライド-ビス(2-エチルヘキシル)セバケート、ポリエチレン、ポリウレタン、ポリカルボナート、ポリエステルのようなポリビニルクロライドの共重合体を含むが、これに限定されるものではない。また、絶縁膜110、111は、絶縁性高分子ペーストをナイロン膜にスクリーンプリントした後、熱処理することによって形成できる。絶縁膜110、111は、多孔性薄膜の面を通した基質の拡散現象を制限し、バイオセンサーの変形を最小化する。多孔性電極とナイロン膜の大きさが図2Cないし図2Fに示したのと同じなら、電氣的連結が絶縁膜で分離され、プリントされ、圧着することによって電極を連結してバイオセンサー系を組み合わせられる。

【0021】

バイオセンサーのこのような形態(図2C〜図2F)は、大量製作時に適する。金を蒸着した多孔性電極と絶縁性カバリーにプリントされた連結部電極は別個に製造でき、作動電極に生物

10

20

30

40

50

活性物質を固定させた後、一連の過程を経て一つに組み合わせられる。血清蒸着方法を使用するには、非対称性二重-対面電極(図2E及び図2F)が対称性二重-対面電極(図2C及び図2D)より容易に製造できる。対称性二重-対面電極は真空を中止した後、電極を二回蒸着させることを必要とする反面、非対称性二重-対面電極はスクリーンプリントされたカウンター電極の反対側面での一時間の蒸着を必要とする。

【0022】

本発明によるバイオセンサーは、迅速かつ簡単であり、非分離形電気化学的免疫分析と分析物質の選択的な検出を可能にする。また、バイオセンサーは電極をさらに必要としないため小型化、現場測定または使い捨てに使用できる。

【0023】

図3に示したように、本発明によるバイオセンサーは、生物活性物質を含む多様な試料の検出のために人体に直接的に使用できる。検出される生物活性物質は、グルコース、コレステロール、ラクテート、クレアチニン、蛋白質、過酸化水素、アルコール、アミノ酸、グルタメートピルバート、及びグルタメートオキサロアセテートを含む。例えば、コレステロール、ラクテート、グルタメート、過酸化水素、及びアルコールは、各々コレステロール、酸化酵素、ラクテート酸化酵素、グルタメート酸化酵素、西洋ワサビ過酸化酵素、またはアルコール酸化酵素を使用して定量分析できる。作動電極に提供される電子伝達媒介体には、フェロセンもしくはその誘導体、キノンもしくはその誘導体、有機伝導性塩、またはピオロゲンを使用する。電子伝達媒介体は、酵素と結合して作動電極に固定され、酸化-還元対を形成できる混合-電子価化合物が好ましい。好ましい化合物には、ヘキサアミルテニウム(III)クロライド、カリウムフェリシアニド、カリウムフェロシアニド、ジメチルフェロセン、フェリシニウム、フェロセン-モノカルボキシル酸、7,7,8,8-テトラシアノキノジメタン、テトラシアフルバレン、ニッケロセン、N-メチルアジニウム、テトラシアテトラセン、N-メチルフェナジニウム、ヒドロキノン、3-ジメチルアミノペンゾイック酸、3-メチル-2-ペンゾチオゾリノンヒドラゾン、2-メトキシ-4-アリルフェノール、4-アミノアンチピリン、ジメチルアニリン、4-アミノアンチピレン、4-メトキシナフトール、3,3,5,5-テトラメチルベンジジン、2,2-アジノ-ジ-[3-エチルベンズアゾリンスルホナート]、o-ジアニジジン、o-トルイジン、2,4-ジクロロフェノール、4-アミノフェナゾン、ベンジジン、及びプルシアンブルーを含む。

【0024】

本発明によるバイオセンサーのまた他の好ましい実施例が、図4A及び図4Bに示されている。前記バイオセンサーは、多孔状薄膜101; 生物学的に活性ある物質が固定されている作動電極104、第1電極連結部105、及び第1リード排出口106からなる第1電極系102; カウンター電極107、第2電極連結部108、及び第2リード排出口109からなる第2電極系103; 1対の絶縁膜110、111; 吸収パッド112; ならびに分析物質が毛細管作用によって注入されるようにする多孔性物質113で作られた薄い膜でできている。

【0025】

図4A、図4B及び図5を参照すると、バイオセンサーの作動原理がさらに詳細に記載されている。分析物質を含む試料溶液2が多孔性電極後面にある吸収パッド112と結合された薄い多孔性物質113を通して毛細管作用により注入される。このような過程で、人体血液に含まれている固体形粒子(ヘマトクリット)のような妨害物質は、大きさ及び電荷排除、極性脂質及び混合されたコントロールにより除去でき、作動電極104に固定されている生物学的に活性ある物質に血清だけが接触できるようになる。生物学的に活性ある物質の触媒作用により、分析物質は容易に酸化されたりまたは還元される物質を生成できる電気化学的に活性がある物質になる。酸化還元できる物質は、電極で電子を与えたり受けたりして、分析物質の濃度に比例する電気的信号を生成するようになり定量測定を可能にする。また、多孔性薄膜101、吸収パッド112、及び薄い多孔性物質113の調節により生成される化学的ポテンシャルの作用により、試料溶液の流れを適当な範囲に調節できる。

【0026】

一方、バイオセンサーの内部に注入される試料溶液2だけではなく、酵素反応により生成

10

20

30

40

50

される物質が吸収パッド112に吸収されて、約30分～約20時間連続的な測定を可能にする。このような形態のバイオセンサーを自体試料採取及び流れ系形バイオセンサーと呼ばれる。連続的に試料が流れるようにするために、連動ポンプ及び複雑な流れチャンネルのような機械的な要素を必要としない。また、連続的な測定が可能であるため、バイオセンサーは図3で示したように血液だけではなく体液にも適用できる。

【0027】

図6A及び図6Bは、本発明による追加的な実施例を示している。図6Aで、バイオセンサーは第1及び第2多孔性薄膜101a、101bと接着性層130を追加に含む。図6Bで、バイオセンサーは第2多孔性薄膜101b、接着成層130、及びプラスチック基質140を追加に含む。

【0028】

本発明によるバイオセンサーは、EIAにより分析蛋白質を検出するために非分離形固体相免疫センサーとして使用できる。

【0029】

図7Aは、本発明によるバイオセンサーの好ましい実施例を示している。図7Aを参照すると、EIA用バイオセンサーは、多孔性薄膜101；生物学的に活性ある物質(抗体)が固定されている作動電極104、第1電極連結部105及び第1リード排出口106からなっている第1電極系102；カウンター電極107、第2電極連結部108、及び第2リード排出口109からなっている第2電極系103；1対の絶縁膜110、111；及び酵素-基質接合体が吸収され乾燥されたパッド114a；ならびに孔117、118がある1対のカバー115、116を含む。

【0030】

図7A及び図8を参照すると、提案された非分離形免疫分析の原理及び連続的な段階がさらに完全に記載されている。分析物質を含む試料溶液(例えば、血液)が上部カバー115に形成されている孔117を通してバイオセンサーに注入される。注入された溶液は、前もって指定された量の酵素-基質接合体が吸収されているパッド114a(例えば、ニトロセルロース膜、紙及びガラス繊維)に接触するようになる。それから、溶液に溶解されている酵素-分析物質接合体と分析蛋白質が作動電極104に吸着されている生物学的に活性ある物質(抗体)に競争的な結合を形成するようになる。結合が十分に形成された後に、接合体酵素の特異的な基質が下部カバー116に形成されている孔118を通して注入される。基質は空隙を貫通するようになり、結合された酵素-分析物質接合体に接触するようになり、酵素反応を開始するようになる。このような反応により、基質が生成物で変形し、電極に伝達された電子が電気的な信号を生成するようになる。電気的な信号が電極系102の表面に伝達され適当な装置により検出される。また、電気的な信号は結合しない酵素-分析物質複合体と基質の反応によっても生成される。しかし、結合しない酵素-分析物質接合体は、電極表面から十分に離れているため酵素-基質反応から生成される電子が電極に到達できない。このような理由で、洗浄段階及び分離段階を省略できる。

【0031】

電気的な信号は捕獲された酵素-分析物質接合体に比例するので、分析蛋白質の量を検定曲線から定量的に測定できる。また、カウンター電極系103は多孔性薄膜101の反対側表面に形成されているため、追加的な電極系を必要としない。したがって、小型化され、非分離形固体相免疫センサーを得られる。

【0032】

図7B、図7C、図7D及び図7Eは、各々本発明による変形されたバイオセンサーのまた異なる好ましい実施例を示している。図7B及び図7Dに示したように、基質が吸収されているパッド114bが追加されていて、これは分析蛋白質をさらに簡単に検出できるようにする。図7C及び図7Dに示したように、ろ過パッド114cが追加されていて、人体血液に含まれている固体粒子(ヘマトクリット)のような妨害物質は、例えば、大きく排除、電荷排除、極性媒質脂質、及び混合されたコントロールにより前もって除去できる。また、蛋白質安定剤または緩衝溶液をろ過パッド114cに吸収でき、分析蛋白質の検出を改善できる。図7Eで示したように、試料溶液が注入される孔117と、基質溶液が注入される基質貯蔵所118'に毛細管により連結される孔118が同じ側に形成されていて、試料と基質溶液をさらに簡単に供給

10

20

30

40

50

できる。連結毛細管119及び基質貯蔵所118'、孔118はパンチングするかまたは下部基板116にエンボス処理することによって形成される。下部基板116がエンボス処理により孔118、連結毛細管119、及び貯蔵所118'を形成すれば、第2下部板は不必要になる。

【0033】

当業者に良く知られているように、酵素-分析物質接合体よりは酵素-抗体接合体がパッド114a内部により良く吸収される。また、適当な酵素-基質対の選択も良く知られている。例えば、尿酸分解酵素-尿酸対、サルコシン酸酸化酵素-サルコシン対、コレステロール酸化酵素-コレステロール対、グリセロール-3-ホスファート酸化酵素-グリセロール-3-ホスファート対、ビルバート酸化酵素-ビルバート対、ジアホラーゼ-NADH対、カタラーゼ-H₂O₂対、L-グルタメート酸化酵素-L-グルタメート対、ビリルビン酸化酵素-ビリルビン対、アルカリホスファート酸化酵素-p-アミノフェノールホスファート対、及びグルコース酸化酵素-グルコース対は、適当な酵素-基質対である(米国特許第5,830,680号参照)。

【0034】

本発明によるバイオセンサーは、非-乾燥された形態で使用できる。

【0035】

図9に示したように、非-乾燥されたバイオセンサーは多孔性薄膜101;抗体が固定されている第1電極系102;第2電極系103;及び1対の絶縁膜を含み、前記第1電極系102は多孔性薄膜101の一表面に形成されていて、第2電極系103は多孔性薄膜101の反対側表面に形成されている。分析物質と酵素-接合体(酵素-分析物質接合体または酵素-抗体接合体)は、第1チェンバー200に位置し、酵素のための基質が第2チェンバー300に位置する。

【0036】

図9に示したように、第1電極系102と第2電極系103が多孔性薄膜101の両側面に共に形成されているため追加的な電極を必要としない。

【0037】

本発明によるバイオセンサーは、抗体生成を誘導できる分析物質などのようなものでも可能である。例えば、C-反応性蛋白質、hCG、PSA、クレアチンホスホキナーゼ(同一酵素MB、BB及びIM)、トロポニン(troponin)、ミオグロビン、軽鎖ミオシン、フィブリノーゲン、チロイド刺激ホルモン、FSH、肝炎抗原、グリケイトされた(glycated)蛋白質(Hb A_{1c}とフラクトサミン等)及びジャガイモウイルスのような多様な特異的なウイルスと関連した多様な蛋白質が可能である。

【0038】

使用できる基質は、使用される酵素により異なる。当業者なら適当な酵素-基質対を簡単に選択できる。例えば、グルコース酸化酵素を酵素に使用する時、好ましい基質はグルコースである。グルコースはグルコース酸化酵素の触媒作用によりグルコン酸に酸化され、H₂O₂を生成する。H₂O₂は約+700mVのポテンシャル(Ag/AgClに対して)で電気的な信号を生成する。

【0039】

反対に、アルカリ性のホスファート酸化酵素が使用された時、p-アミノフェニルホスファートが好ましい。p-アミノフェニルホスファートはアルカリ性のホスファート酸化酵素の作用により電気的に活性がある物質のp-アミノフェノールを生成するようになり、適用されたポテンシャルの+190mV(Ag/AgClに対して)の最適な電気的信号を生成して追加に酸化される。

【0040】

反面、西洋ワサビ過酸化酵素は、H₂O₂を基質に使用する。電子伝達媒介体を使用されるFe(II)は、Fe(III)に酸化される。Fe(III)の還元により形成される電流は-100mVの還元ポテンシャルを適用することによって検出できる。

【0041】

酵素、電子伝達媒介体または抗体のような生物学的に活性ある物質が作動電極に物理的な吸着、または化学的な結合により固定され得る。生物学的に活性ある物質溶液を作動電極に滴下した後、培養することによって物理的な吸着ができる。このような方法は、生物学

10

20

30

40

50

的に活性ある物質と電極を形成する物質間の親和力を利用する。化学的な結合は作動電極の表面に形成される活性化された自体-組み合わされた単一層を利用する。アルキルチオール、アミン及びカルボキシル酸のような反応性化合物を使用する多様な方法により、作動電極の表面を変形させられる。生物学的に活性ある物質を自体-組み合わせた単一層の形態に共有結合させられる(Meyerhoff等, Mikrochim. Acta. 1995年、第117巻、P.195-206)。

【0042】

下記実施例を通して、本発明をより理解することができる。これは、説明をするためのものであって、本発明がこれに限定されるものではない。

【0043】

反応物

使用された物質と反応物質を下記に示す：

グルコース酸化酵素(GOx)：EC 1.1.3.4, VII-s 形態, 245-900単位/g, Aspergillus Nigerから入手)； 2-[N-メルホリノ]エタンスルホン酸(MES)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC)、N-ヒドロキシルホスホニルイミド(NHS)、カリウムフェリシアニド($K_3Fe(CN)_6$)、 β -D-グルコース、2-メルカプトエチルアミン、及びDL-6,8-チオチン(thiotionin)酸アミン(Sigmaから入手、St. Louis, Missouri, USA)； 1,2-ジチオラン-3-ペンタノイック酸、3-メルカプトプロピオニック酸、11-メルカプトウンデカノイック酸、16-メルカプトヘキサデカノイック酸(MHDA/C16)、及びフェロセンアセト酸($Fe(COOH)_2$) (Aldrichから入手、Milwaukee, Wisconsin, USA)； リン酸水素二ナトリウム及びリン酸二水素ナトリウム(Kanto Chemicalから入手、Tokyo, Japan)； ニトラン(Nytran)中性多孔性ナイロン膜(空隙の大きさ $0.2\mu m$) (Schleicher及びSchull of Keene, New Hampshireから入手)； 及びニトロセルロース(NC)膜(Whatman Internationalから入手、Maidstone, 英国)。使用した他の物質は、すべて等級分析に該当するものである。

【0044】

試料と標準溶液は、ホスファート緩衝食塩水(PBS, 140mM NaCl)で準備した。すべての水溶液は蒸留水で製造した(18M Ω cm)。アルカリ性のホスファート酸化酵素(AKP)、p-ニトロフェニルホスファート、アビジン(卵の白身から入手)、ビオチン(ビタミンH)、及びゼラチンと血清アルブミン(BSA)は、ミズーリ州セントルイス(St. Louis, Missouri)のシグマ社(Sigma)から購入した。p-アミノフェニルホスファートは、p-ニトロフェニルホスファートから合成した。緩衝溶液の製造に使用した蒸留水は、ヤマモトミリポ WQ 500(抵抗：18M Ω)だった。

【実施例1】

【0045】

(1-1) 対称性二重-対面多孔性金電極の製作

多孔性ナイロン膜(15 \times 30mm²)を半径6mm及び幅13mmの排出口ストリップを持った適当なカバー膜を下に置いた(電気的な連結のための目的)。物理的な蒸着方法を使用して、膜の両面を金でコーティングした；時間300秒、圧力75mmTorr、血清電流25-30mA、ポテンシャル350-500Vでスパッタリングした。これは、外部半径4mm及び厚み約300Åで膜の中心にディスク形態の金電極を生成した。テトラヒドロフラン(THF)(1:6w/v)に溶解させたPVC(33% PVCと67% ビス(2-エチルヘキシル)セバケート(全てw/w))を、せまい金リッド排出口を含み中心ディスク電極にキャストした。これは、6mmディスク形態の金電極が中心で接しないようにした。電極の形態は図2Aに記載されている。他の実施例で、金をカバー膜なしにナイロン膜(6 \times 6cm²)の両面にコーティングさせて、図2Aに記載された形態に切断した。金でコーティングされた電極の一部をスクリーン-プリントされた電極連結部がある二個の絶縁膜間に位置させて圧着し、対称性二重-対面多孔性電極を組み合わせた。

【0046】

1-2) 非対称性二重-対面多孔性金電極の製作

緑より中心が薄い形態の中心を持った作動電極の形態のカウンター電極をナイロン膜の1面に炭素ペースト(または銀/塩化銀等の伝導性あるペースト)でスクリーンプリントした

10

20

30

40

50

。膜の反対側面に対しては実施例1-1で記述した物理的な蒸着方法を実施して金電極を製造した。金電極を図2Eに示した形態に切断して、スクリーン-プリントされた電極連結部を持った2個の絶縁膜間で圧着させた。非対称性二重-対面多孔性電極の電気化学的特徴は、緩衝溶液を含むFe(III)/Fe(II)でサイクリックボルタモグラム(スキャン速度:60mV/分)を使用して調査した。図10に示したように、電極は蒸着された金とスクリーン-プリントされた炭素間の短絡なしに可逆的な反応を提供した。

【0047】

1-3) 生物学的に活性ある物質の固定化

電極をMES緩衝溶液で洗浄して、pH7.4、10mg/mlG0xと140mM NaClを含む10μlの攪拌状態のホスファート緩衝溶液に即時に入れ、1時間維持して金電極の表面にG0xが物理的に吸着

10

されるようにした後、ホスファート緩衝溶液で洗浄した。

【0048】

1-4) グルコースセンサーの製作

空隙があるニトロセルロース(NC)ストリップと吸収パッドとしてガラス繊維間に多孔性金ストリップ電極を積層させ、図4A及び図4Bで示した自己試料採取及び流れ系形グルコースセンサーを製作した。

【0049】

1-5) グルコースセンサーを利用した分析

グルコースセンサーを利用した分析試験をするために、標準グルコース溶液を使用して、電流測定分析法によりグルコースの安定-状態反応を測定した。図11は、0.8Vポテンシャルでバイオセンサーの典型的な検定曲線を示している。これは、前記グルコースセンサーが約30分間グルコースに対して感応できることを示したものである。0mg/dLないし200mg/dL濃度のグルコース範囲で直線形感応を得ることができた。傾きは、 2.60×10^{-3} nA/(ng/dL)で、補正常数は、0.988だった。前記結果から、本発明によるバイオセンサーにより連続的な自体試料採取及び検出が可能であることが確認できた。

20

【実施例2】

【0050】

2-1) 金電極の製作

実施例1-1に記述したのと同じ方法で金電極を得た。

【0051】

2-2) 生物学的に活性ある物質の固定化

電極をMES緩衝溶液で洗浄して、pH7.4、10mg/mlG0x、200mMカリウムフェリシアニド、140mM NaClを含む10μlの攪拌状態のホスファート緩衝溶液に即時に入れ1時間維持した後、ホスファート緩衝溶液で洗浄した。

30

【0052】

2-3) グルコースセンサーの製作

空隙のあるNCストリップと吸収パッドのガラス繊維間に多孔性金ストリップ電極を積層させ、自体試料採取及び流れ系形グルコースセンサーを製作した。

【0053】

2-4) グルコースセンサーを利用した分析

グルコースセンサーを利用した分析試験をするために、電流測定分析法によりグルコースの安定-状態感応を測定した。図12は、グルコース分析に対し0.38Vポテンシャルでバイオセンサーの典型的な動的感応曲線を示している。これは、グルコースセンサーが各々のグルコース溶液(50mg/dL、100 mg/dL及び200mg/dL)に対し感応できることを示している。図12は、グルコース分析に対し典型的な動的感応曲線を示している。0mg/dLないし200mg/dL濃度のグルコース範囲で直線形感応を得られた。傾きは、85.8nA/(mg/dL)で、補正常数は0.998だった。前記結果は、0.38Vの非常に低い電圧下でもより感度が高いグルコース感応を得られることを示している。前記結果から、本発明によるバイオセンサーにより、連続的な自体試料採取及び検出が可能であることを確認できた。

40

【実施例3】

50

【0054】

図7Aに例示されている非分離形固体相免疫センサーを製造した。

【0055】

3-1) 金電極の製作

実施例1-1に記述したのと同じ方法で金電極を得た。

【0056】

3-2) バイオセンサーの製作

電極をMES緩衝溶液で洗浄した。0.05mg/mlアビジン及び0.05Mナトリウムカルボナートを
含むpH9.6のホスファート緩衝溶液を作動電極に滴下した。それから、電極を4℃で16時間
培養した。パッド114aとしてグルコース酸化酵素-ピオチン接合体(2.5µg/ml)50µlが吸
収されているガラス繊維膜(ワットマンインターナショナル, Maidstone, 英国)を使用し
た。

10

【0057】

3-3) 検定

実施例3-2から得た免疫センサーで検定を行なった。標準ピオチン溶液を 10^{-5} Mから 10^{-14} M
の濃度まで希釈した。標準溶液各々を上部カバー115に形成された孔117を通じて免疫セン
サーに注入した。アビジンとピオチンまたは酵素接合体間の競争結合は、通用ポテンシヤ
ル+800mVで安定化させた。それから、基質(グルコース)を下部カバー116に形成された孔1
18を通じて注入した。酵素反応により生成された電流を測定した。図13は検定曲線を示し
ている。前記曲線で、電流変化はピオチンの濃度により異なることが分かる。最適信号差
は、ピオチン 10^{-7} M(1.0µA)と 10^{-10} M(0.5µA)で見られた。

20

【0058】

3-4) 信号変化の測定

実施例3-2で得た免疫センサーを用いて動的感応曲線を得た。 10^{-12} Mピオチン緩衝溶液と 1
 0^{-4} Mピオチンがない緩衝溶液を各々免疫センサーに注入した。センサーが安定状態にある
ようにした後、グルコース溶液10µlを孔118を通じてセンサーの後面から注入した。免疫
センサーの動的感応曲線を電流測定分析法により測定して、その結果を図14に示した。

【0059】

図14は、 10^{-12} Mピオチン緩衝溶液の電流変化が1µAで、 10^{-4} Mピオチン 緩衝溶液の電流変
化が0.4µAであることを示している。ピオチンがない緩衝溶液の電流変化は、約0.05µA
だった。前記結果からこのような形態の免疫センサーは適当な抗原-抗体反応のために変
形できることが分かった。

30

【実施例4】

【0060】

非分離形固体相C-反応性蛋白質(CRP)免疫センサーは、実施例3-1及び3-2で記述と同様な
生物活性物質固定方法により図7Eに示した形態に製造した。抗-CRP(0.0125mg/ml)を物理
的な吸着により金電極に固定させ、実施例3-1のグルコース酸化酵素-ピオチンの代りにア
ルカリホスファート酸化酵素(ALP)をCRP(及び-CRP; 0.2mg/ml)に対する連結酵素として
使用した。実施例3-2のグルコースの代りにp-アミノフェニルホスファート(5mg/ml)を使
用した。再構成された血清に既知量のCRPを溶解させて標準CRP溶液を製造し、図7Eに示
したバイオセンサーの孔117に注入した。基質p-アミノフェニルは孔118に注入し、これ
は毛細管119を通じて貯蔵所118'へ伝達され、電極系100(図7E)の微細空隙を通じて拡散され
電気化学的の信号を生成した。適用ポテンシャル+150mVで免疫センサーの電流感応は、電
流測定分析法により測定し、その結果を図15に要約した。

40

【0061】

図15に示したように、 10^{-6} mg/ml CRP/血清溶液に対する電流変化は0.75µAで、 10^{-4} mg/ml
CRP/血清溶液に対する電流変化は0.6µAだった。前記結果から免疫センサーは、非常に
高い感度でCRP検出のために使用できることが確認できた。

【図面の簡単な説明】

【0062】

50

【図 1】従来の拡散セルの配置を図示したもので、一つの電極だけが多孔性薄膜に形成されている。a：分析物質溶液、b：基質溶液

【図 2 A】本発明の実施例 1 によりひとつの全体ストリップに形成されている対称的な多孔性電極を基礎にしたバイオセンサーの分解斜視図である。

【図 2 B】本発明の実施例 1 によるバイオセンサーの斜視図である。

【図 2 C】バイオセンサーを変形したもので、対称的な多孔性電極を基礎にしたバイオセンサーの分解斜視図であり、本発明の実施例 1 により電極連結部が二つの絶縁基質に分離されているものである。

【図 2 D】本発明の実施例 1 のバイオセンサーを変形したバイオセンサー 図 2C の斜視図である。

【図 2 E】バイオセンサーを変形したもので、非対称的な多孔性電極を基礎にしたバイオセンサーの分解斜視図であり、本発明の実施例 1 により電極連結部が二つの絶縁基質に分離されているものである。

【図 2 F】本発明の実施例 1 によるバイオセンサーを変形したバイオセンサー 図 2E の斜視図である。

【図 3】本発明の実施例 1 によるバイオセンサーを適用する例を説明した図面である。

【図 4 A】本発明の実施例 2 によるバイオセンサーの分解斜視図である。

【図 4 B】本発明の実施例 2 によるバイオセンサーの斜視図である。

【図 5】本発明の実施例 2 によるバイオセンサーを試料溶液に適用する例を説明した図面である。

【図 6】A 及び B は本発明の実施例 2 から変形した試料毛細管が組み合わされているバイオセンサーの断面図である。

【図 7 A】本発明の実施例 3 によるバイオセンサーの分解斜視図である。

【図 7 B - 7 E】本発明の実施例 3 によるバイオセンサーの多様な変形形態を示したものである。

【図 8】提案された非分離免疫分析の原理及び段階を示した図面である。

【図 9】本発明による拡散セルの配置を図示したものである。

【図 10】実施例 1 でカリウムフェリシアニドが電極の酸化還元剤に使用された時、非対称的な多孔性電極を基礎にしたバイオセンサーの円形ボルタモグラムである。

【図 11】グルコース分析のためにグルコース酸化酵素が作動電極に物理的に固定されている実施例 1 によるバイオセンサーの典型的な検定曲線である。

【図 12】グルコース酸化酵素とカリウムフェリシアニドが作動電極に物理的に固定されている実施例 2 によるバイオセンサーの動的感応曲線である。

【図 13】酵素-分析物質接合体としてグルコース酸化酵素-ビオチン接合体を使用し、抗体にアビジンを使用した実施例 3 によるバイオセンサーの検定曲線である。

【図 14】実施例 3 によるバイオセンサーの動的感応曲線である。

【図 15】実施例 4 による CRP バイオセンサーの検定曲線であり、多孔性電極前面部に固定された CRP 抗体、上段パッド部で乾燥されたアルカリホスファート水和酵素-CRP 接合体、及び下部パッドを通して浸漬された p-アミノフェニルホスファートを信号を得るために使用した。

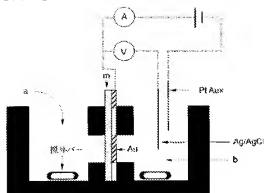
10

20

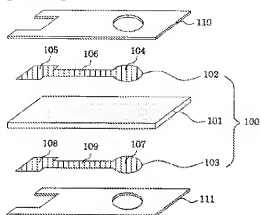
30

40

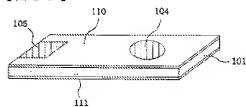
【図 1】



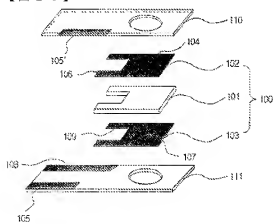
【図 2 A】



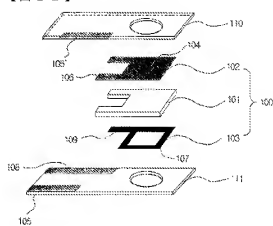
【図 2 B】



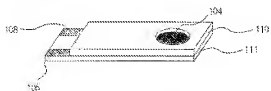
【図 2 C】



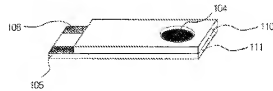
【図 2 E】



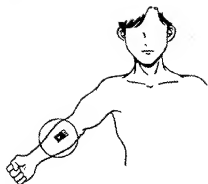
【図 2 D】



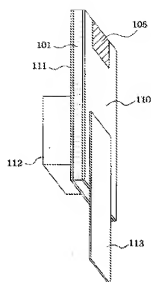
【図 2 F】



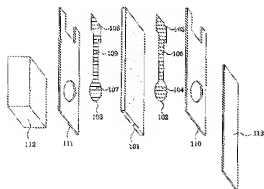
【図 3】



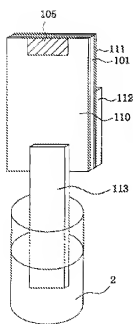
【図 4 B】



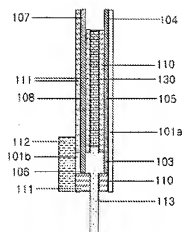
【図 4 A】



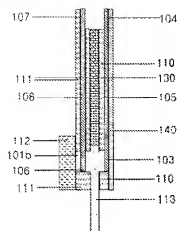
【図 5】



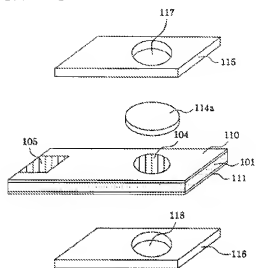
【図 6 A】



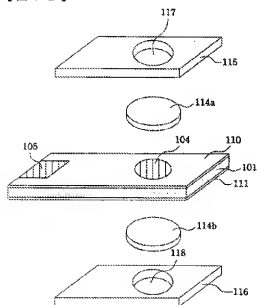
【図 6 B】



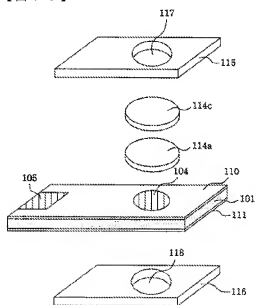
【図 7 A】



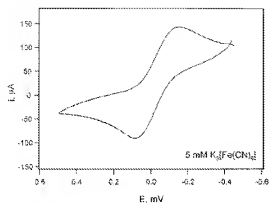
【図 7 B】



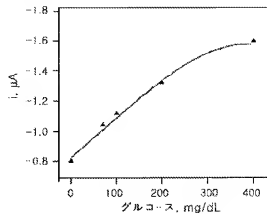
【図 7 C】



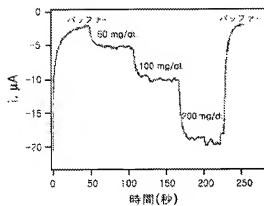
【図 10】



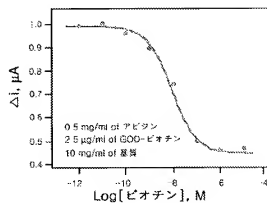
【図 11】



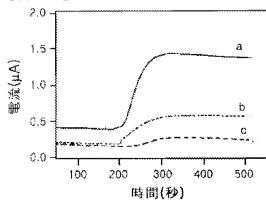
【図 12】



【図 13】



【図 1 4】



【図 1 5】

